專題論述

水稻抗病及防禦反應基因的全基因組分析

王子明 [1]、胡澤寬 [1]、王強生 [2]*
[1]國立中興大學農藝學系
[2]行政院農委會農業試驗所農藝組

摘要

近年來，許多已被選殖成功的植物抗病基因(disease resistance gene, *R*)皆可編碼NBS (nucleotide binding site)-LRR (leucine-rich repeat)功能區塊(domain)，能辨識病原菌分泌蛋白(elicitor, Avr protein)，進而能保衛植物；使植物僅具有少數的NBS-LRR 基因，亦能防禦多樣的病原菌。藉由已知抗病基因的分子結構，以生物資訊學(bioinformatics)的方法，跨越研究材料及分析系統的限制，找出水稻全基因組的抗病基因約有 600 個，可分為 4 至 9 群；此一策略提供基因選殖與利用此類基因的另一有效途徑。藉由結合目前已建構大量的病原菌接種後水稻基因表現組群 (gene expression profiles)資料，可以快速且同步地觀察抗病及防禦反應相關基因的數量及種類。發現大部份的防禦反應基因，並不具專一性，均於染感後 4 至 24 小時表現，產生作用，而抗病基因是在植物被感染前即已表現。本文的目的即在介紹利用演算法(algorithm)及基因表現分析的資料，找尋的水稻抗病及防禦反應相關的基因，並將此等基因以比較基因體學 (comparative genomics)的方法，鏈結古典遺傳質量基因座、數量性狀基因座(quantitative trait loci, QTLs)及基因組核苷酸序列，並標定在水稻 12 對染色體上，進行抗病相關基因的全基因體學分析。

關鍵詞：抗病基因、防禦反應基因、比較基因體學、全基因組分析、核苷酸結合位置、白胺酸重覆功能區塊。

Whole Genome Analysis of Disease Resistance and Defense-response Genes of Rice

Arthur Z. Wang[1], Tzer-Kaun Hu[1] and Chang-Sheng Wang[2]*

[1] Department of Agronomy, National Chung-Hsing University, Taichung 40227, Taiwan ROC
[2] Agronomy Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung Hsien 41301, Taiwan ROC

ABSTRACT

In recent years, many plant disease resistance genes (*R*) have been cloned and identified, which encode NBS (nucleotide binding site)-LRR (leucine-rich repeat) domain, and may recognize elicitor (Avr protein) to protect plant from various pathogens even with few NBS-LRR genes. Stridden across the barrel of materials and analyses in disease resistance researches, about 600 (grouped into 4 to 9 types) *R* genes have been predicted by using bioinformatic tools according to sequences of NBS-LRR, and will facilitate the cloning and utilization of these genes. Through analyzing the databases of rice gene expression profiles after pathogens inoculation, we may

* 通信作者，cswang@wufeng.tari.gov.tw
投稿日期：2005 年 7 月 15 日
接受日期：2005 年 8 月 29 日
作物、環境與生物資訊 2:267-281 (2005)
Crop, Environment & Bioinformatics 2:267-281 (2005)
189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung Hsien 41301, Taiwan ROC

quickly and simultaneously study the number, types, and genes related to disease resistance and defense-response. Results showed that most defense-response genes were not specific and expressed at 4 to 24 hours after inoculation. However, *R* genes have started expression prior to inoculation. In this paper, we introduced the identification of rice disease resistance and defense-response genes by integration of algorithm and gene expression profiles. Through the comparative genomics, we analyzed the whole rice genome by connecting the identified genes with traditional genetic loci, quantitative trait loci, genes associated with disease resistance and defense-response, and eventually located on 12 chromosomes of rice genome.

Key words: Disease resistance gene, Defense-response gene, Comparative genomics, Whole genome analysis, NBS, LRR.

前言

植物抗病基因(disease resistance gene, *R*)與病原的致病基因(avirulence gene, *Avr*)間的專一性關係在基因對基因(gene-for-gene)的理論前題下，大多符合單一基因座的古典遺傳模式(Flor 1955, 1971)。被感染的抗病植物細胞能專一辨識病原分泌物(elicitor, Avr protein)，即如抗原-抗體間的專一性辨識，產生局部的過敏反應(localized hypersensitive response)現象，導致被感染的細胞進入程式性細胞死亡(programmed cell death, PCD)，阻擋病原的擴散；並且誘導防禦反應相關基因(defense-response gene)的啟動，進而生成活化氧族(reactive oxygen species, ROS)、水楊酸(salicylic acid)及離子流動(Heath 2000)等。已知植物可編碼(encode)五類抗病基因的蛋白質(R protein)，其中最大一類蛋白含有核苷酸結合位置(nucleotide binding site, NBS)或 NB-ARC 功能區塊(domain)(PF00931, Pfam database, Bateman *et al.* 2004)及白胺酸重覆功能區塊(leucine-rich repeat domain, LRR; PF00560, Pfam database)，亦即 NBS-LRR 蛋白。近年來，許多已被選殖成功的植物抗病基因座皆含有可編碼 NBS 及 LRR 的功能區塊序列，簡稱 NBS-LRR 或 NBS 基因(NBS-encoding gene)，如水稻抗稻熱病基因座 *Pib* (Wang *et al.* 1999)、*Pita* (Bryan *et al.* 2000)及水稻抗白葉枯病基因座 *Xa21* (Song *et al.* 1995)，*Xa1* (Yoshimura *et al.* 1998)及 *Xa26*(t) (Sun *et al.* 2004)等。依據基因對基因的抗病遺傳理論，植物為了能辨識各種病原及其生理小種，必須同時具備許多抗病基因，才能符合專一性抗病及達成持久抗性(durable resistance)。從抗原-抗體蛋白質生化理論的觀點，NBS-LRR 蛋白能夠辨識病原 Avr 蛋白，進而能保衛植物；即使植物僅具有少數的 NBS-LRR 基因，亦能防禦多樣的病原。因此，分析植物全基因組的 NBS-LRR 蛋白，有助於了解抗病的分子機制(Dangl and Jones 2001)。

水稻為基因體研究的模式植物，除了具有完整的遺傳圖譜(genetic map)、物理圖譜(physical map)及比較圖譜(comparative map)外，也擁有大量數量性狀基因座(quantitative trait loci, QTLs)定位及基因表現組群(gene expression profile)的資料。利用比較基因體學(comparative genomics)的方法可以鏈結古典遺傳質的基因座、數量性狀基因座及基因組核苷酸序列(Chen *et al.* 2002, Ware *et al.* 2002, Wu *et al.* 2002, Yuan *et al.* 2003)。已知水稻抗病基因座廣泛地分佈在基因組中，因此如欲以據圖選殖(map-based cloning)策略分離各別基因座仍有困難。但利用病原菌接種後的植物基因表現資料，可以快速且同步地了解抗病及防禦反應相關基因的數量及種類。藉由

已知抗病基因的分子結構，以生物資訊學(bioinformatics)的方法，可以跨越研究材料及分析系統的限制，找出全基因組與抗病相關基因的數量及種類，能為此類基因之選殖與利用提供另一有效率地途徑。

本文的目的為介紹利用演算法(algorithm)及基因表現資料找尋水稻的抗病及防禦反應相關的基因。並將此等基因與抗病質量、數量性狀基因座標定在 12 對染色體上，進行水稻抗病相關基因的全基因體學分析。

水稻 NBS 基因的全基因組模擬分析

NBS 是一種在原核及真核生物中新發現的功能區塊(domain)，它的生化功能與 ATP 及 GTP 鍵結有關(Saraste *et al.* 1990)。其中胺基酸序列保留性最強的區域(motif)為磷酸結合環(phosphate-binding loop)，簡稱為 P-loop；另有四個胺基酸序列保留區域為 Kinase-2、RNBS-B (resistance nucleotide binding site-B)、GLPL (保留序列中具有 GLPL 的區域)及 MHDV(保留序列中含有 MHDV 等 8 個保留胺基酸的區域)。而 P-loop 至 Kinase-2 或 GLPL 保留區域的核苷酸序列，常被設計成退化引子對(degenerated primer set)利用 PCR 擴增基因組(genomic) DNA 的方式選殖基因，進而作為 NBS 基因的分類依據(Meyers *et al.* 1999)。NBS 基因普遍存在植物基因組，除了具有編碼 NBS 的功能區塊外，在 NBS 胺基端(N-terminus)常編碼有 *Toll*/interleukin-1 receptor (TIR) homology region、coiled-coil (CC) domain 及非 TIR 或 CC 一類的 non-TIR (nT) 等區塊，而極少數為 serine-rich domain。MHDV 保留區域位於 NBS 羧基端(C-terminus)，其後接有 LRR、C-terminal domain 或未知特性序列(Fig. 1)。Meyers *et al.* (1999)利用 9 個已知核苷酸序列的植物 *R* 基因座做為比對條件(query)，同時對不同基因資料庫進行序列相似性搜尋比對，以 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, nucleotide query to nucleotide database, E-value<0.0001) 或 TBLASTN (translated nucleotide query to translated nucleotide database, E-value<0.0001)程式比對，結果發現在 25 個作物及阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana* Col-0)中，共有 481 個

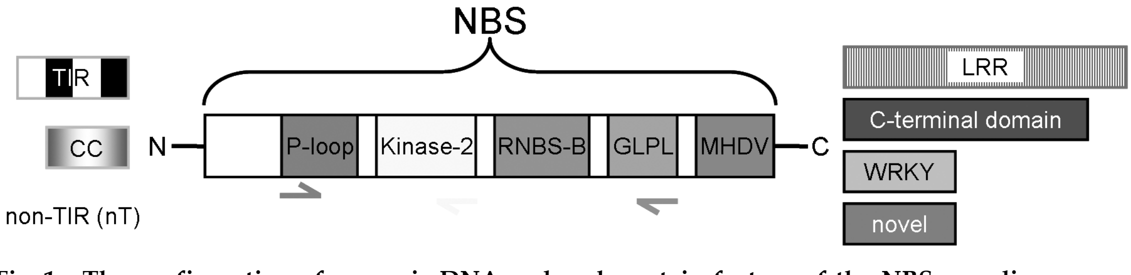

Fig. 1. The configuration of genomic DNA and each protein feature of the NBS-encoding genes. P-loop, Kinase-2, RNBS-B, GLPL and MHDV are the conserved motifs with consensus amino acid sequences in the NBS domain. TIR, CC and non-TIR (nT) domains present in the N-terminal region of the NBS-LRR-encoded genes. LRR, C-terminal domain, WRKY domain, and novel domain present in the C-terminal region of the NBS-encoding genes. (adapted from Meyers *et al.* 2003)

含有可編碼 NBS 的核苷酸序列，包含 14 個植物已知的 *R* 基因座、NBS 基因及 NBS 基因的 PCR 擴增片段。其中 146 個序列為阿拉伯芥的 PAC (P1-derived artificial chromosome)及 BAC (bacterial artificial chromosome)殖系(clone)，這些逢機分佈長序列殖系的核苷酸數總和佔阿拉伯芥基因組的 50%以上。由此得知，NBS 基因搜尋比對結果的解釋能力，可以涵蓋 50%的阿拉伯芥基因組，而且以多基因模式存在阿拉伯芥基因組中。為了進一步分析 NBS 基因序列的核苷酸組成，利用其中保有完整 P-loop 至 GLPL 保留區域的 248 個核苷酸序列，以其轉譯後的胺基酸序列進行親緣分析(phylogenetic analysis)。轉譯後的胺基酸序列以 hidden Markov model (HMM)及 CLUSTALW 程式執行多序列比對(multiple sequence alignment)分析，結果可將序列依相似性的高低劃分成不同區塊。再經 Multiple Expectation Maximization for Motif Elicitation (MEME)程式，分析出 NBS 蛋白質的高度保留區域(Meyers *et al.* 1999)。

將 HMM 搜尋所得的 159 個具 NBS 功能區塊的基因，以 CLUSTALW 及 HMM 二種分群程式交互驗證，區分出不同的序列結構，再以 TBLASTN 驗證不同結構序列的再現性，並進一步確認基因組中是否還有未發現的序列。最後進行人工序列註解，定出核苷酸序列的內含子/外顯子(intron/exon)及蛋白質的功能區塊與保留區域，結果發現各功能區塊或保留區域可組合出 14 種(共 207 個)NBS 蛋白，據此將基因(種類)分為 TIR-NBS-LRR (TNL)，CC-NBS-LRR (CNL)及其它(TN、TX 或 CC)三大類(Table 1, Fig. 2, Fluhr 2001, Meyers *et al.* 2002, Meyers *et al.* 2003)。

Table 1. The classification and number of genes similar to plant resistance (*R*) gene in Arabidopsis genome.

Predicted protein domains	Letter code	Full manual
CC-NBS-LRR	CNL	51
NBS_{CC}-LRR	NL	4
TIR-NBS-LRR	TNL	83
NBS_{TIR}-LRR	NL	2
TIR-NBS-LRR-X	TNLX	5
TIR-NBS- TIR-NBS-LRR	TNTNL	2
TIR-TIR-NBS-LRR	TTNL	2
Total with LRRs		149
TIR-NBS	TN	21
TIR-X	TX	30
X-TIR-NBS-X	XTNX	2
CC-NBS	CN	4
CC-NBS-X	CNX	1
CC (related to CNL)	C	1
NBS_{CC}	N	1
Total without LRRs		58
Total		207

(adapted from Meyers *et al.* 2003)

藉由阿拉伯芥 NBS 蛋白質的分析經驗及結果，進行水稻全基因組的 NBS 蛋白質分析。Bai *et al.* (2002)利用 P-loop 至 MHDV 保留區域的胺基酸序列，設計一組可複製 900bp 的退化引子對，經 PCR 擴增、選殖及核苷酸定序，在水稻基因組中，共獲得 144 個可編碼全長 NBS 的 DNA 片段。再以 TBLASTN (scores>1e-4)比對 GenBank ，Monsanto Rice Genome Sequence Database 及 Indica rice database 等資料庫中的水稻基因組序列，共獲得 1080 個可編碼全長 NBS 的核苷酸序列。依據演算胺基酸序列一致性(identity <75%)，劃分選殖成功的 PCR 擴增片段。以其中 112 個殖系做為探針，進行南方墨漬分析，檢驗秈稻品種 IR64、二個粳稻品種

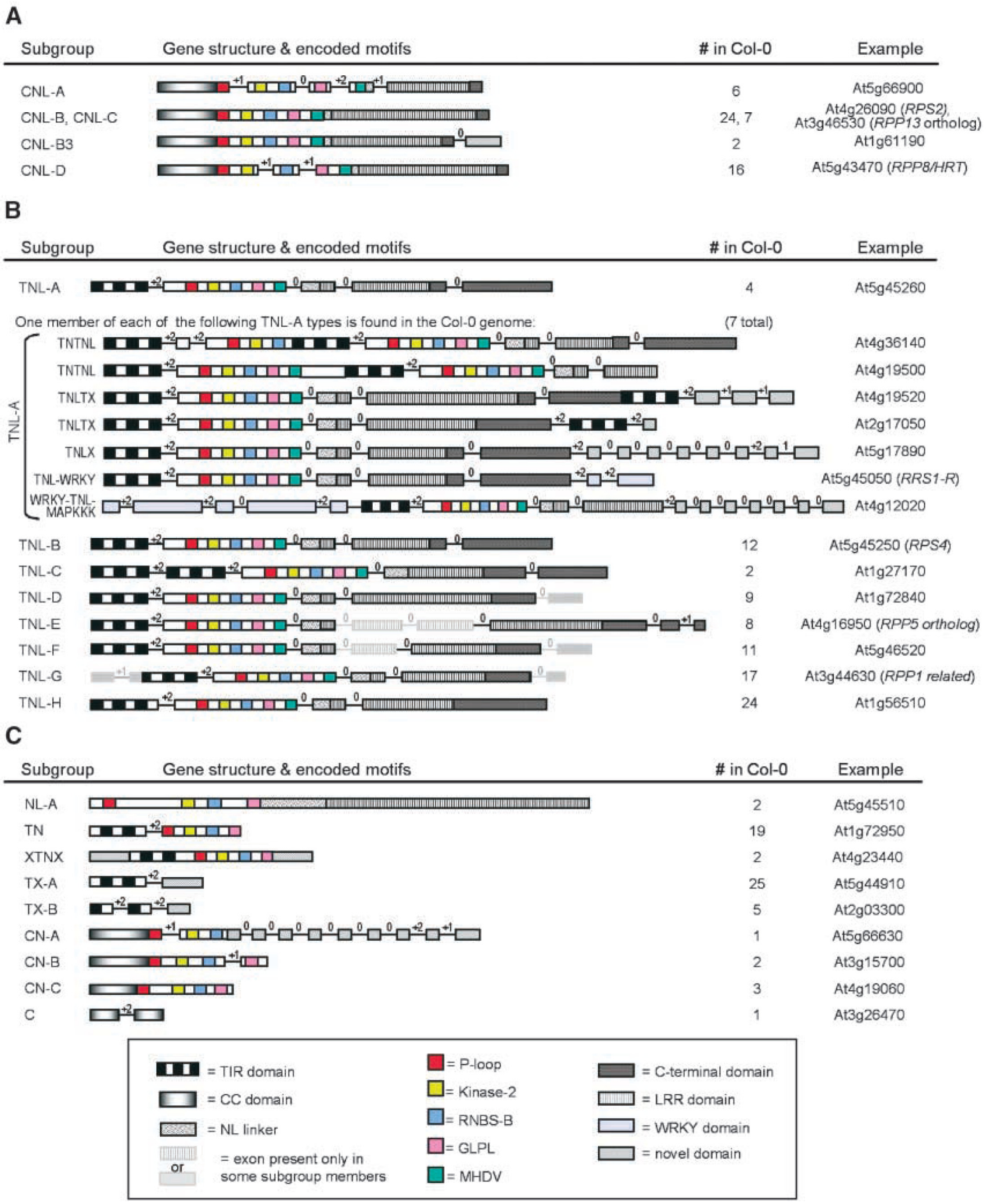

Fig. 2. **The configuration of genomic DNA and protein features of the algorithmed NBS -encoding genes in Arabidopsis. Boxes indicate exons, while thin lines indicate introns. Each motif in encoded NBS domain is respectively displayed with colors, whereas encoded others protein domains are displayed with gray. All elements are drawn approximately to scale and shown where available. (adapted from Meyers *et al.* 2003)**

Azucena、Gihogyeo 及秈稉稻雜交品種 Milyang23，估算實際水稻基因組中可編碼 NBS 的基因數目。試驗結果發現重複數較多的 rNBS79 殖系確實呈現較多的實體重複數，且感病品種 IR64 與抗病品種 Milyang23 間也呈現有多型性條帶的差異(Fig. 3)。經相似性比對所獲得的 250 個預測的全長基因(predicted full-length gene)，以程式 HMMER 2.2g 尋找胺基酸保留區域。經分群後，發現水稻基因組中僅有四種類型，即 NBS，nT-NBS-LRR (>600 個)、nT-NBS (50 個)、TIR-NBS (4 個)及 TIR (1 個)，與阿拉伯芥的 14 種分群結果差異極大。水稻基因組中幾乎不具 TIR 及 CC 功能區塊，而且 LRR 區塊保留性也較低(Table 2)。

早先由於 Bai *et al.* (2002)進行水稻分析時所使用的資料庫尚不完全，因此當水稻基因組完全解序並公布後，Monosi *et al.* (2004)及 Zhou *et al.* (2004)又分別進行 NBS 基因分析。雖然二個團隊使用的分析程式及流程完全依照 Meyers *et al.* (2003)的報告，但由於保留區域的判定會因主觀意識的加入而造成差異，所以二個團隊分析所得 NBS 基因的分群種類與數目不同，但基因數目之估計相近。Monosi *et al.* (2004)將 NBS 基因分為 7 群，共 585 個；Zhou *et al.* (2004)分為 9 群，共 535 個。其中仍以 nT-NBS-LRR 佔最多數(約 80%)，並有極少數的基因不具有 TIR 及完全不具 TIR-NBS-LRR 的現象，與阿拉伯芥基因組的 NBS 基因分群特性完全不同，顯示物種間的 NBS 基因差異極大。

利用生物資訊的方法進行水稻全基因組的分析，係完全依據電腦的運算來預測水稻 NBS 相似基因，為一種推測基因的演算策略，然而，預測所得的 NBS 基因是否具有抗病能力，是否能辨識病原菌分泌物進而產生水稻-病原菌間的交互作用及其抗病機制為何，均需要以實驗來進一步證明，方有應用價值。

水稻接種白葉枯病菌及稻熱病菌後的基因表現

當植物細胞辨識到病原分泌物時，局部細胞及組織會產生過敏性反應，此時防禦反應基因亦同步啟動(Heath 2000)。因此水稻以人工接種病原菌後，分析感染部位的 RNA 或蛋白質，應該能忠實地表現出抗病與防禦反應的基因或蛋白質。

Wang *et al.* (2001)將稻熱病原菌(*Magnaporthe grisea*)分離株(isolate) PO6-6 接種於稉稻品種 Yashiro-mochi，分別萃取不同組織部位及發育時期的 RNA，構築 cDNA 基因庫，建構基因表現資料庫(expressed sequence tags, ESTs, database)。

Table 2. Consensus sequence of the conserved motif in NBS domains in different classes of NBS-encoding genes.

Gene class	P-Loop	Kinase-2	RNBS-B	GLPL	MHDV
TIR-NBS-LRR	GIGKTT(il)A	KVL(ivl)(vl)LDDVD	GSRII(iv)TT(qre)D	G(gn)LPLGL	MH(ndkr)LLQQ
nT-NBS-LRR	GMGG(vli)GKTTL	(lv)(lvi)(vl)DD(vl)W	GS(kr)(vi)(lva)(fl)T(ts)R	GLRLAL	MHD(vm)(vlim)R(ed)
nT-NBS	VGK(skr)TLV	L(vi)(vi)(vi)E(lf)xxD	GSK(iv)I(iv)xSR	GSF(ilm)xAN	Not conserved
TIR-NBS	SGIGKTEL	L(lv)(iv)IDNL	HV(il)(iv)TTR	GLW(iv)V	Not conserved

Small letters in parentheses indicate residues that occur in similar frequencies at a single position. (adapted from Bai *et al.* 2002)

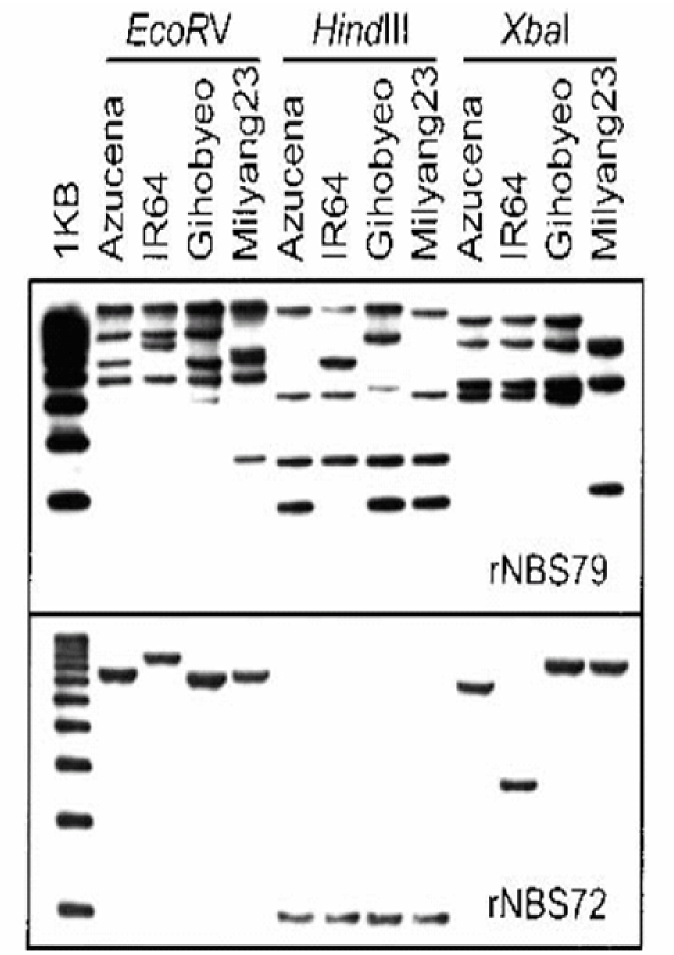

Fig. 3. Southern analysis for estimation of copy number of different NBS-encoding genes in the rice genome. The rNBS79 and rNBS72 probes of the NBS domain amplified by PCR were hybridized respectively to DNA blot of four rice varieties digested with three restriction enzymes to estimate copy number of different NBS-encoding genes in the rice genome. (adapted from Bai *et al.* 2002)

結果在 162 個 cDNA 殖系中，有 13 個編碼為抗病基因之 putative receptor kinase，NBS-LRR 及 LRR。大多數則與防禦反應基因相似，如已知的 protein kinase、protein transporter、phosphatase、MAPK、transcription factor 及 pathogenesis-related protein (PR)。進一步地將三個殖系：1H6 (receptor-like kinase)、2H5 (putative membrane channel protein)為一防禦反應基因及 1G1 (putative tumor suppressor, located near *Pia*)為一抗病基因，做為北方墨漬分析的探針，分析抗稻熱病近同源系 C101A51(具抗病基因座 *Pi2*)與其感病回交親 CO39，接種後進行基因表現量及表現時期的比較。結果 1H6 及 2H5 在接種後 4 小時才開始反應，1H6 在品系間不具差異性表現，但抗病品系的 2H5 持續表現至 48 小時。進一步地擴大試驗規模，利

用稻熱病原菌染感 8 個不同的 cDNA 基因庫，分析其 ESTs 資料扣除比對及北方墨漬分析，結果發現 cDNA 基因庫中防禦反應基因佔約 0.3～0.32%，亦於接種後的 6 至 24 小時大量表現(Jantasuriyarat *et al*. 2005)；顯示防禦反應基因的表現在抗、感品系間是不具顯著差異性，且均表現於病原菌接種之後。1G1 抗病基因於接種後 0 小時即有表現，且抗病品系表現量大於感病品系 (Fig. 4) (Wang *et al*. 2001)。一個似 Serine/Threonine kinase (即 Xa21-like protein)的抗病基因僅於接種後 0 及 72 小時表現(Jantasuriyarat *et al*. 2005)；顯示抗病基因是在植物被感染前即表現。

Wen *et al*. (2003)以人工接種的方式，分析稻熱病原菌及白葉枯病原菌與抗病近同源系及感病回交親間的防禦反應基因表現。利用 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)分析 12 個特定的防禦反應基因。結果 EI12I1 (WRKY-type DNA-binding protein)、BI26N5 [translation initiation factor (GOS2)]、EI35I3

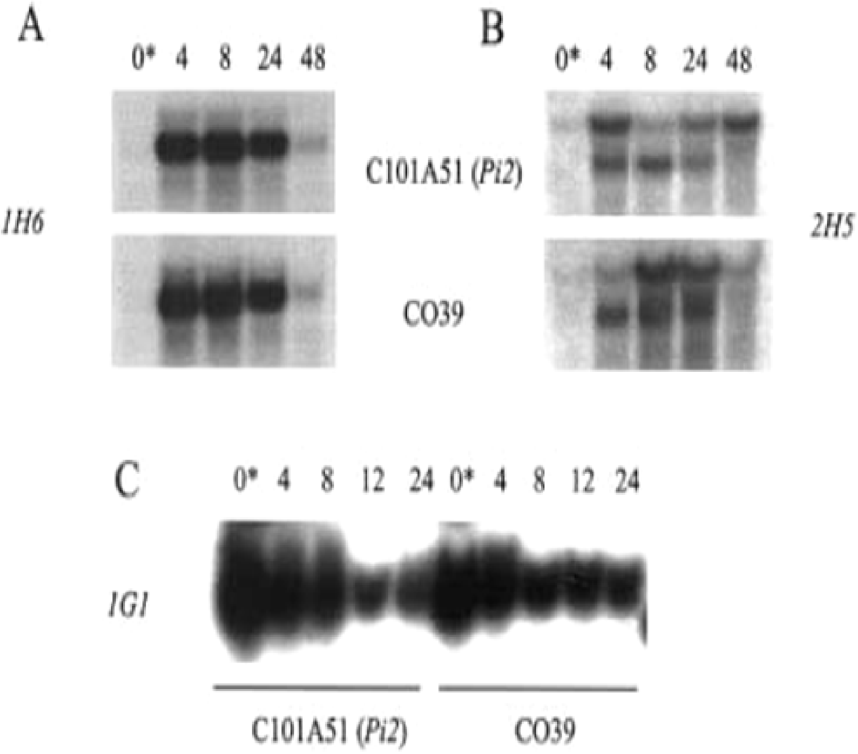

Fig. 4. The gene expression profile of disease resistance and defense-response genes between rice blast resistant and susceptible lines. Northern analysis of three ESTs (A, 1H6, B, 2H5, C, 1G1) in resistant line C101A51 (carries rice blast resistant locus *Pi2*) and susceptible line CO39 after inoculation with the blast isolate PO6-6 to detect the amount and the period of the specific expressed genes between resistant and susceptible rice lines. Numbers (0, 4, 8, 12, 24, 48) in the figure represent hours after inoculation with blast isolate. (adapted from Wang *et al.* 2001)

(thiamine biosynthetic enzyme)、EI10P9 [polyubiqutin (Rubq I)]、EI1K8 (light-Induced mRNA) 及 EI5P11 (Nt-gh3 deduced protein)等基因，不論在稻熱病菌或白葉枯病菌接種水稻試驗中皆有表現，且主要表現於接種後 1 至 3 天；顯示這 6 個基因不具病原專一性。而 EI12I1、BI26N5、EI35I3 及 EI10P9 等基因只在抗病品種系中表現，即與不相容作用 (incompatible reaction)有關；顯示這 4 個基因為防禦反應基因，與基因比對結果一致。EI35K2 (unknown protein)僅在抗稻熱病品種系中表現，而 EI19D23 (RNA helicase)、EI28H1 (acylaminoacyl-peptidase like protein)及 EI44N14 (unknown protein)等基因僅在抗白葉枯病品種系中表現，顯示這 4 個基因具病原專一性表現。EI13J2 基因(proteosome component)僅在稻熱病分離株 IK81-3 接種於抗稻熱病品系 C101LAC 上表現，而 EI10L24 基因(WEB1/SEC31-like transport protein)僅在白葉枯病生理小種 PXO99 接種於抗白葉枯病品系 IRBB13 上表現。其中，EI13J2 及 EI10L24 基因不但具病原菌專一性表現，更為生理小種專一性表現，因此可做為單一品種系 - 病原菌生理小種的分子標誌。

由於 IRBB13 (*xa13*)與白葉枯病生理小種 PXO99 間具有專一小種抗性，因此 Chu *et al*. (2004)構築一個抗病近同源系 IRBB13 與其感病回交親 IR24 間的病原菌誘導扣除 cDNA 庫(pathogen induced subtraction cDNA library)及一個 IRBB13 接種與不接種誘導間的扣除 cDNA 庫。經定序 1152 個 cDNA 殖系後，共獲得 1050 個較長的 ESTs。以程式 ESTClustering 分群整理後，最後產生 702 個獨特序列 (unique sequence)。經 BLAST 比對後，有 44 個(6%) ESTs 與抗病及防禦反應基因相似；更有 14 個 ESTs 與抗病基因有極高一致性 (identify)，其中 4 個為 NBS-LRR，另外 10 個為 Xa21-like protein。

藉由水稻接種病原菌後的基因表現分析可以得知，防禦反應基因是由抗病基因所誘導，因此大部份的防禦反應基因是不具任何專一性，即使水稻感病品種(系)也會表現，唯獨在表現量及表現時間會有所差異。

抗病及防禦反應基因的比較圖譜

已知水稻抗病基因座是以多基因形式廣泛地分佈在基因組中，尚有許多未知的抗病基因未被發現，因此要選殖各別基因座並解序是有困難的。由於水稻具有完整的遺傳圖譜、物理圖譜，並且擁有抗病、蟲等許多數量性狀基因座的定位圖譜。所以利用比較基因體學的方法鏈結不同系統的圖譜與核苷酸序列，可以快速且同步地分析基因組內抗病相關基因的種類、數量及位置，找出與抗病相關的未知基因，進而全面性地探討抗病基因的功能，進而利用在抗病育種上。

Monosi *et al.* (2004)將電腦運算產生的 585 個 NBS 基因，依所相對應的 BAC 或 PAC 殖系與高密度遺傳連鎖圖譜(high-density genetic linkage map, Harushima *et al.* 1998) 及物理 - 遺傳合併圖譜 (integrated physical and genetic map, Chen *et al.* 2002)結合後，將所得的 NBS 基因標定在水稻物理圖譜上，進而與已定位的抗稻熱病及抗白葉枯病基因座，進行對照、比較，結果發現，同一類的 NBS 基因會在同一對染色體 1cM 範圍內產生群聚現象，尤其以第 11 對染色體最為顯著(Fig. 5)。Zhou *et al.* (2004)的分析結果也是如此，共有 15 個群聚位置；染色體片段重複(duplication)造成的群聚，是解釋這種現象最簡單的理由。運

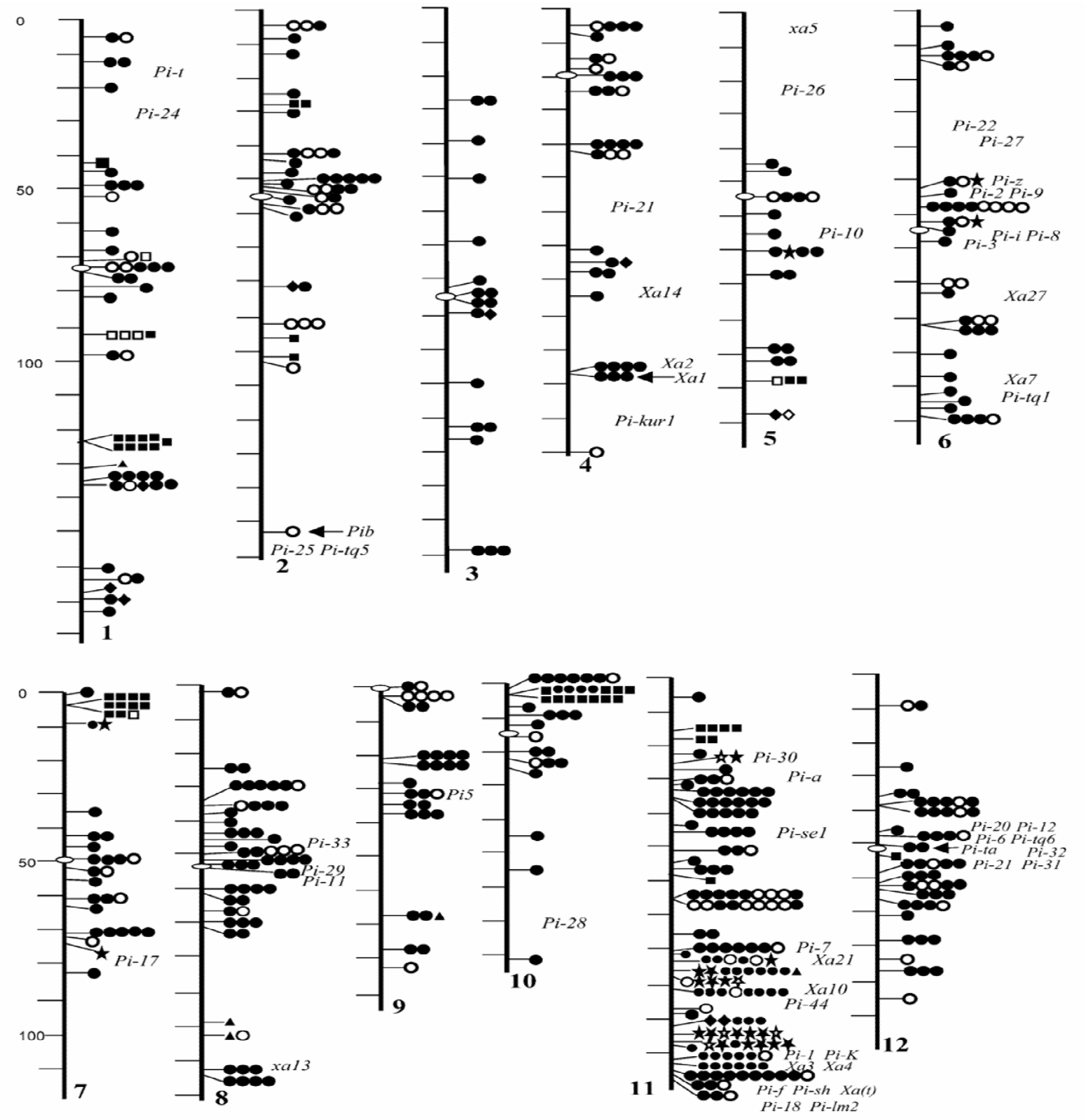

Fig. 5. Distribution of the algorithmed NBS-encoding genes in the rice genome. The skeleton of map is based on the high-density rice genetic linkage map. The scale on the left side of the chromosome indicates genetic map position (cM). The NBS-encoding genes and known rice disease resistance loci are represented on the right side of the chromosomes (vertical lines) based on genomic clones and molecular markers as follows: *circles* class 2, *squares* class 3, *stars* class 4, *diamonds* class 5, *triangles* class 6. Open ovals indicate centromeres. NBS-encoding genes whose sequences are located on the same BAC (or PAC) clone or clustered within 1 cM region of map are drawn on the same location. The genetic symbols of rice disease resistance loci are represented as follows: *Pi-*, rice blast resistance loci and *Xa-*, rice bacterial blight resistance loci designated. (adapted from Monosi *et al.* 2004)

算 NBS 基因除了對應到基因序列相似性比對模版的 *Pib*、*Pita*、*Xa1* 基因外，其餘 NBS 基因群聚叢位置的標定，亦可發現抗病基因座。部份已知抗病基因座沒有對應到運算 NBS 基因的原因是：由於電腦運算出錯，還是有另一類非 NBS 類的抗病基因？由第五對染色體上基因座的基因選殖得知，*xa5* 編碼為 gamma subunit of transcription factor IIA (TFIIAgamma) (Iyer and McCouch 2004)，依其功能可歸類為防禦反應基因，也就是利用電腦運算產生的 NBS 基因確實與抗病有關聯。

Wang *et al.* (2001)觀察水稻感染稻熱病菌後的基因表現，將實際所得抗稻熱病病相關的 109 個 ESTs 標定於高密度遺傳連鎖圖譜上，並與抗病 QTLs 資料結合。同樣的

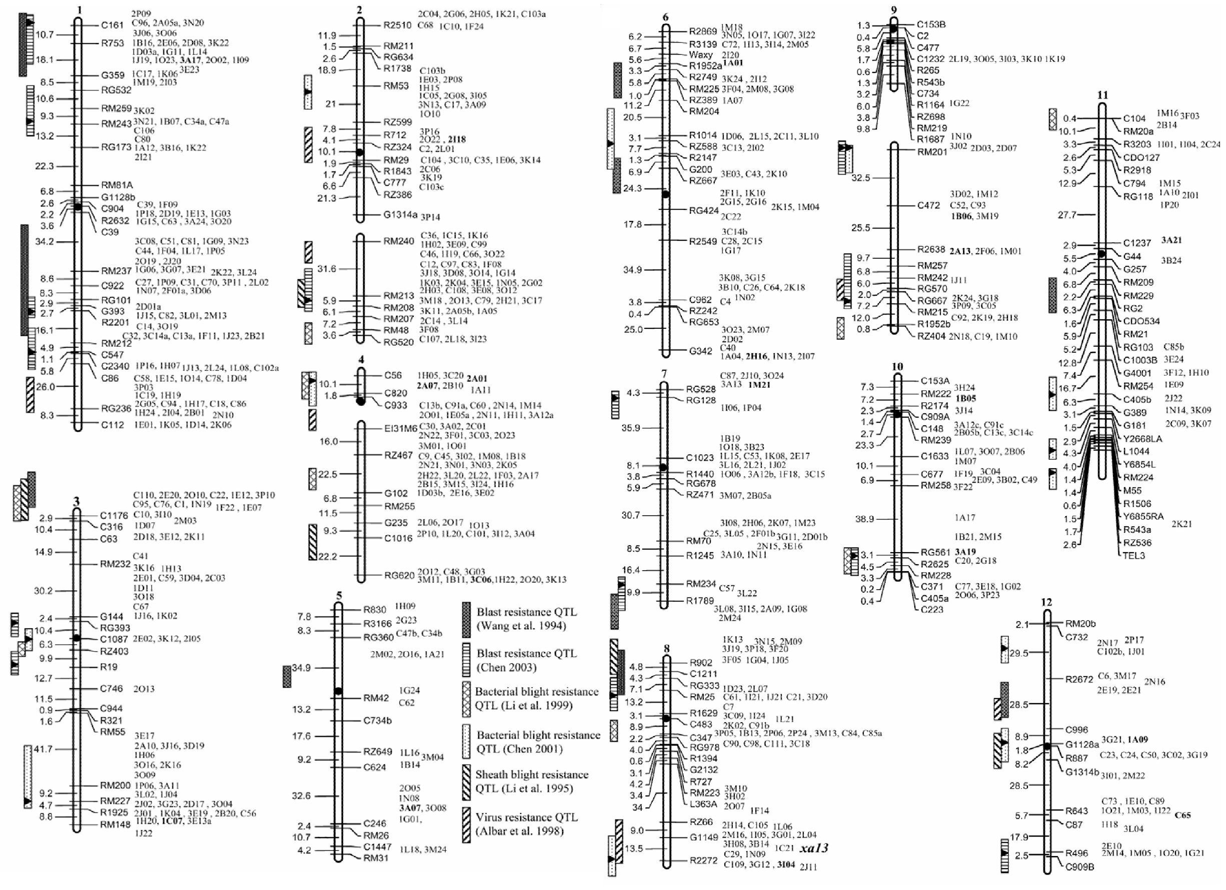

Fig. 6. Distribution of defense-response ESTs involved in rice bacterial blight resistance in rice genome. The skeleton of map is based on the high-density rice genetic linkage map. The numbers with vertical lines labeled on the left side of the chromosome indicate genetic distance (cM) of genetic molecular markers, whereas the serial names with vertical lines labeled on the right side indicate genetic molecular markers. The filled circles represent the centromere. The rectangles placed on the left side of the chromosome mean the distribution and of different rice disease resistance QTLs, whereas the serial names placed on the right side mean ESTs induced after inoculated with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.

Chu *et al*. (2004)觀察水稻感染白葉枯病菌後的基因表現，將實際所得抗白葉枯病相關的 702 個 ESTs 與抗病 QTLs 共同標定於高密度遺傳連鎖圖譜上(Fig. 6)。結果發現各 ESTs 平均地分佈於各對染色上，但所對應到的抗病基因(NBS-LRR 或 Xa21-like protein)數目[13 個(Wang *et al*. 2001)及 14 個(Chu *et al*. 2004)]卻沒有運算來的 NBS 基因多。Chu *et al*. (2004)所使用分析材料是僅具一個抗白葉枯病基因座 *xa13* 的近同源系 IRBB13，然而位於 *xa13* 基因座附近的 ESTs，沒有一個是 NBS 或 Xa21-like protein 基因，但 Monosi *et al*. (2004)運算所得的 NBS 基因卻可明確地對應到 *xa13* 基因座(Fig. 7)。此外，Wang *et al*. (2001)使用的材料是具抗稻熱病基因座 *Pi62*(t)的栽培種 Yashiro-mochi，亦沒有發現其它抗病相關基因座的表現。可能原因是：由於材料限制，基因表現資料會忠實地反應當時生物狀態，因此無法觀察到其它抗病基因座之表現，但卻提供其它防禦反應基因的大量同步表現資料。

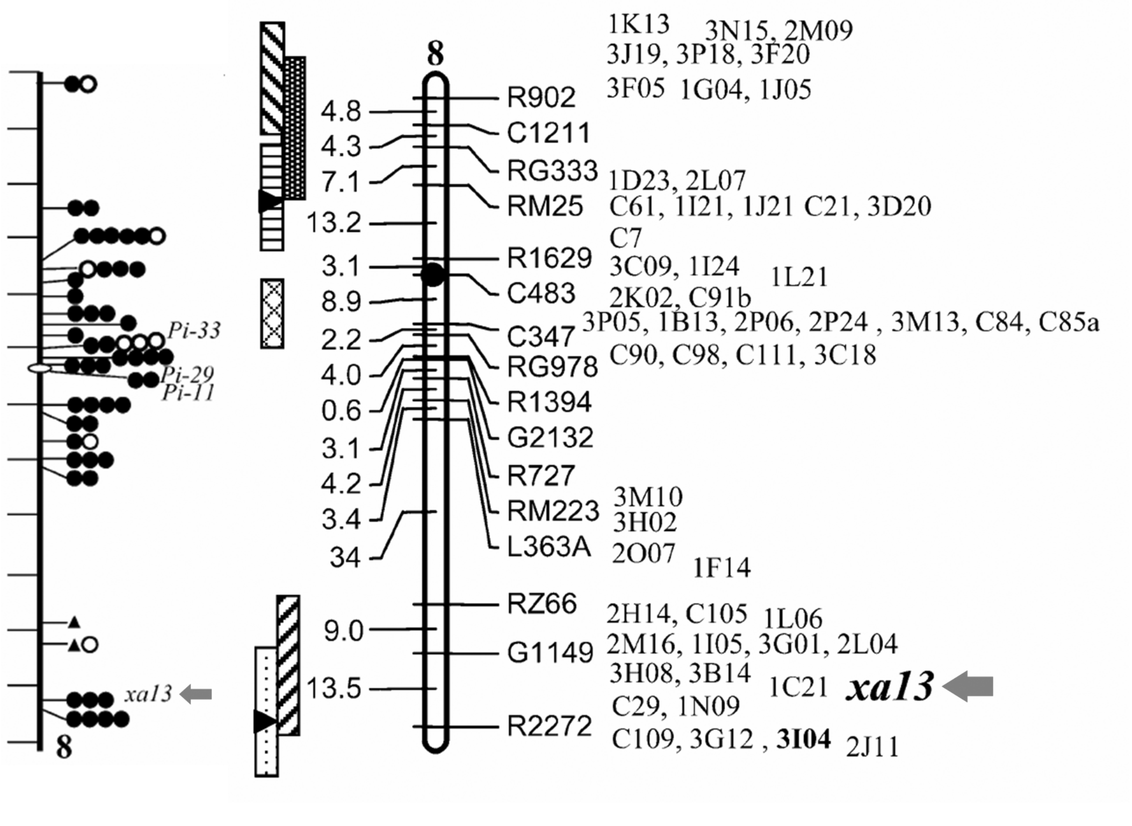

Fig. 7. The location of rice bacterial blight resistance loci *xa13* on chromosome 8. The left chromosome map is the distribution of the algorithmed NBS-encoding genes (adapted from Monosi *et al.* 2004), and the right is the distribution of ESTs involved in rice bacterial blight resistance (adapted from Chu *et al.* 2004). The arrows indicate the location of loci *xa13*. According to the distribution of the algorithmed NBS-encoding genes, loci *xa13* should be NBS-encoding genes. However, the ESTs close to loci *xa13* are neither NBS-encoding genes nor *Xa21*-like genes.

結論

藉由生物資訊的方法找尋抗病基因的數量及種類，可以不受時間、空間及材料的限制，且可隨資料庫之註解隨時更新。因此，僅由電腦運算推測，就可從水稻基因組中找出近 600 個 NBS 基因(Bai *et al.* 2002, Monosi *et al.* 2004, Zhou *et al.* 2004)。由於目前對抗病基因及其所編碼蛋白質之序列結構及保留區域的了解並不夠清楚。所以這 600 個基因的序列特性及生物功能有待實驗驗證。但 Li *et al.* (2001)僅從田間感病檢定分析的結果，即推論 *Xa4* 與 *Xa21* 是完全顯性的專一生理小種抗病基因座，而 *xa5* 與 *xa13* 可能扮演著調節抗病路徑的角色。

由已選殖 *Xa21* 為 NBS-LRR 基因(Song *et al.* 1995)，*Xa4* 與 NBS-LRR 基因緊密連(Sun *et al.* 2003)及已選殖 *xa5* 為 gamma subunit of transcription factor IIA (Iyer and McCouch 2004)的報告結果來驗證 Li *et al.* (2001)的推論，發現田間感病檢定分析結果，與實際分子遺傳的分析結果一致，再一次證實運算 NBS 基因的可信度。水稻接種後的基因表現資料，雖然沒有辦法像電腦運算一樣地快速且大量的分析，卻可以忠實地反應當時抗病基因及防禦相關基因的種類及表現量。藉由生物資訊及比較圖譜的輔助，使得實驗的進展快速化、大量化，並能串連他人的研究成果，得以延伸研究的觸角，甚至進行跨物種的分析(Chen *et al.* 2003)，使複雜的抗病基因研究得以實行。

從全基因組比較圖譜中，常發現抗病基因、基因座或 QTLs 的分佈有跨病原菌作用的現象。就 NBS 蛋白質能夠辨識病原 Avr 蛋白質，進而能保衛植物的觀點推論，不同病原菌及生理小種間的差異應是 Avr 蛋白質的變異，而植物抗病基因間的差異是 NBS 蛋白質辨識 Avr 蛋白質能力的差異。因此，依據基因對基因抗病遺傳理論，植物必須同時具備多種 NBS 基因，才能達成持久抗病目標。實際田間作業上，可以利用分子標誌追蹤白葉枯病抗病基因座 *Xa4*、*xa5*、*xa13* 及 *Xa21*，即可進行分子標誌輔助選拔(marker assisted selection, MAS)，以及組合各個抗病基因(Huang *et al.* 1997)。各重組品系不但能維持原本的抗病專一性，並且可以累加基因數目，抗病作用力可以提高(Li *et al.* 2001)，更可以遺傳工程製作持久抗病品種的策略變得可行。所以不論是以雜交或基因轉殖的方式，都將可以有效地將水稻抗病基因導入目標品種(系)，以進行抗病育種。在抗病基因作用力可以累加，並有效地遺傳的理論下，將所有抗病基因導入同一品種中，育成超強抗病品種或持久抗病品種是可期的。

引用文獻

Bai J, LA Pennill, J Ning, SW Lee, J Ramalingam, CR Webb, B Zhao, Q Sun, JC Nelson, JE Leach, SH Hulbert (2002) Diversity in nucleotide binding site-leucine-rich repeat genes in cereals. **Genome Res**. 12: 1871-1884.

Bryan G, TK-S Wu, L Farrall, Y Jia, HP Hershey, SA McAdams, GK Donaldson, R Tarchini, B Valent (2000) A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. **Plant Cell** 12: 2033-2046.

Chen M, G Presting, WB Barbazuk, JL Goicoechea, B Blackmon, G Fang, H Kim, D Frisch, Y Yu, Sun Shouhong, S Higingbottom, J Phimphilai, D Phimphilai, S Thurmond, B Gaudette, P Li, J Liu, J Hatfield, D Main, K Farrar, C Henderson, L Barnett, R Costa, B Williams, S Walser, M Atkins, C Hall,MA Budiman, JP Tomkins, M Luo, I Bancroft, J Salse, F Regad, T Mohapatra, NK Singh, AK Tyagi, C Soderlund, RA Dean, RA Wing (2002) An integrated physical and genetic map of the rice genome. **Plant Cell** 14: 537-545.

Chen H, S Wang, Y Xing, C Xu, PM Hayes, Q Zhang (2003) Comparative analyses of genomic locations and race specificities of loci for quantitative resistance to *Pyricularia grisea* in rice and barley. **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA 100: 2544-2549.

Chu Z, Y Ouyang, J Zhang, H Yang, S Wang (2004) Genome-wide analysis of defense-responsive genes in bacterial blight resistance of rice mediated by the recessive Rgene *xa13*. **Mol. Genet. Genomics** 271: 111-120.

Dangl JL, JD Jones (2001) Plant pathogens and integrated defense responses to infection. **Nature** 411: 826-833.

Flor HH (1955) Host-parasite interaction in flax rust-its genetics and other implications. **Phytopathol.** 45: 680-685.

Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. **Annu. Rev. Phytopathol.** 9: 275-296.

Fluhr R (2001) Sentinels of disease. Plant resistance genes. **Plant Physiol.** 127: 1367-1374.

Harushima Y, M Yano, A Shomura, M Sato, T Shimano, Y Kuboki, T Yamamoto, S Yang Lin, BA Antonio, A Parco, H Kajiya, N Huang, K Yamamoto, Y Nagamura, N Kurata, GS Khush, T Sasaki (1998) A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population. **Genetics** 148: 479-494.

Heath MC (2000) Hypersensitive response-related death. **Plant Mol. Biol.** 44: 321-334.

Huang N, ER Angeles, J Domingo, G Magpantay, S Singh (1997) Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-aided selection using RFLP and PCR. **Theor. Appl. Genet.** 95: 313-320.

Iyer AS, SR McCouch (2004) The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. **Mol. Plant Microbe Interact.** 17: 1348-54.

Jantasuriyarat C, M. Gowda, K. Haller, J. Hatfield, G. Lu, E. Stahlberg, B. Zhou, H. Li, H. Kim, Y. Yu, RA. Dean, RA. Wing, C. Soderlund, G-L Wang (2005) Large-Scale Identification of Expressed Sequence Tags Involved in Rice and Rice Blast Fungus Interaction. **Plant Physiol.** 138: 105-115.

Li Z-K, A Sanchez, E Angeles, S Singh, J Domingo, N Huang, GS Khush (2001) Are the dominant and recessive plant disease resistance genes similar?: A case study of rice R genes and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Races. **Genetics** 159: 757-765.

Meyers BC, M Morgante, RW Michelmore (2002) TIR-X and TIR-NBS proteins: Two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in *Arabidopsis* and other plant genomes. **Plant J.** 32: 7-2.

Meyers BC, A Kozik, A Griego, H Kuang, RW Michelmore (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 15: 809-834.

Meyers BC, AW Dickerman, RW Michelmore, S Sivaramakrishnan, BW Sobral, ND Young (1999) Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. **Plant J.** 20: 317-332.

Monosi B, RJ Wisser, L Pennill, SH Hulbert (2004) Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. **Theor. Appl. Genet.** 109: 1434-1477.

Bateman A, L Coin, R Durbin, RD Finn, V Hollich, S Griffiths-Jones, A Khanna, M Marshall, S Moxon, ELL Sonnhammer, DJ Studholme, C Yeats, SR Eddy (2004) The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res.** (32): D138-D141.

Saraste M, PR Sibbald, A Wittinghofer (1990) The P-loop a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. **Tr. Biochem. Sci.** 15: 430-434.

Song WY, GL Wang, LL Chen, HS Kim, LY Pi, T Holsten, J Gardner, B Wang, WX Zhai, LH Zhu (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. **Science** 270(5243): 1804-1806.

Sun X, Z Yang, S Wang, Q Zhang (2003) Identification of a 47-kb DNA fragment containing *Xa4*, a locus for bacterial blight resistance in rice. **Theor. Appl. Genet.** 106: 683-687.

Sun X, Y Cao, Z Yang, C Xu, X Li, S Wang, Q Zhang (2004) *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. **Plant J.** 37: 517-527.

Wang ZX, M Yano, U Yamanouchi, M Iwamoto, L

Monna, H Hayasaka, Y Katayose, T Sasaki (1999) The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. **Plant J.** 19: 55-64.

Wang Z, G Taramino, D Yang, G Liu, SV Tingey, G-H Miao, G-L Wang (2001) Rice ESTs with disease-resistance gene- or defense-response gene-like sequences mapped to regions containing major resistance genes or QTLs. **Mol. Genet. Genomics** 265: 302-310.

Ware D, P Jaiswal1, J Ni1, X Pan, K Chang, K Clark, L Teytelman, S Schmidt, W Zhao, S Cartinhour, S McCouch, L Stein (2002) Gramene: a resource for comparative grass genomics. **Nucleic Acids Res.** 30: 103-105.

Wen N, Z Chu, S Wang (2003) Three types of defense-responsive genes are involved in resistance to bacterial blight and fungal blast diseases in rice. **Mol. Genet. Genomics** 269: 331-339.

Wu J, T Maehara, T Shimokawa, S Yamamoto, C Harada, Y Takazaki, N Ono, Y Mukai, K Koike, J Yazaki, F Fujii, A Shomura, T Ando, I Kono, K Waki, K Yamamoto, M Yano, T Matsumoto, T Sasaki (2002) A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. **Plant Cell** 14: 525-535.

Yoshimura S, U Yamaouchi, Y Katayose, S Toki, Z-X Wang, I Kono, N Kurata, M Yano, N Iwata, T Ssaski (1998) Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA 95: 1663-1668.

Yuan Q, S Ouyang, J Liu, B Suh, F Cheung, R Sultana, D Lee, J Quackenbush, CR Buell (2003) The TIGR rice genome annotation resource: Annotating the rice genome and creating resources for plant biologists. **Nucleic Acids Res.** 31: 229-233.

Zhou T, Y Wang, J-Q Chen, H Araki, Z Jing, K Jiang, J Shen, D Tian (2004) Genome-wide identification of NBS genes in japonicarice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. **Mol. Genet. Genomics** 271: 402-415.

－編輯：楊純明